

IVF culture medium and long-term child development

Citation for published version (APA):

Zandstra, H. (2019). *IVF culture medium and long-term child development*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. ProefschriftMaken Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20190201hz>

Document status and date:

Published: 01/01/2019

DOI:

[10.26481/dis.20190201hz](https://doi.org/10.26481/dis.20190201hz)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

9

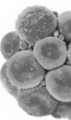
Summary



SUMMARY

Chapter 1 provides a general introduction, as well as an outline of this thesis. It is known that children born after an IVF treatment are at increased risk for adverse perinatal outcome such as low birthweight (LBW) and preterm birth (PTB) compared with naturally conceived children. The etiology behind the observed differences is still to be elucidated. Several possible explanations have been proposed such as differences in patient characteristics, effects induced as a result of the ovarian hyperstimulation or several technical factors involved with the handling and culture of the gametes and embryos necessary for the IVF treatment. In animal studies, it has been repeatedly observed that changes in the culture medium can cause perinatal and postnatal differences affecting long-term health of the offspring. Evidence from human studies is not yet as convincing, which can be partially explained by the many challenges that are involved in research with effects of culture medium on postnatal development of the offspring. In 2010, we published the results of a study where we compared outcome of children born after embryo culture in two different commercially available culture media. Surprisingly the children born as a result of IVF culture in Vitrolife G1, version 3 (Göteborg, Sweden) culture medium were significantly heavier at birth than the children born after embryo culture in K-SICM (Cook Medical, Brisbane Australia) culture medium. From the Barker hypothesis and the DOHaD hypothesis, it is known that low birthweight is a precursor of an increased risk for (cardiac) diseases in adult life. This thesis focuses on the effects of culture medium on birthweight and on long-term postnatal development of the children born after an IVF/ICSI treatment.

In **Chapter 2** we performed a structured literature review on the relationship between culture medium in human IVF and birthweight published before October 15th 2014. We included a total of 11 studies that were relevant for the research question. Conventional meta-analysis was not possible since almost all studies compared different culture media. This makes it impossible to provide one answer since all comparisons are different. In the 11 papers, a total of 22 comparisons were done with 19 different culture media couples. Five of the included studies found significant differences in birthweight when offspring born after culture in different culture media were compared and the remaining studies did not find any differences in birthweight. All studies had several methodological issues, such as a retrospective design in most studies, small sample sizes in the randomized or alternating studies and often a comparison of culture media that were used over a consecutive period of time. Also, the exact composition of the culture media is not publically accessible. As a result, although in both animal and human studies there is increasing evidence that culture medium can affect perinatal outcome like birthweight, the actual effect of culture medium on growth of IVF offspring is still not



definitively elucidated. More research might also have to focus on effects of different ingredients of the culture media, on long-term effects of culture medium on health and epigenetic (de)regulation of IVF offspring.

In **Chapter 3, 4 and 5** we discuss the results of our prospective observational cohort study (MEDIUM-KIDS). To assess how the children from our first culture medium study are developing we performed a prospective observational cohort study. In this study, parents of all singletons from our first culture medium study published in 2010 were approached, to participate in a follow-up study (MEDIUM-KIDS) after the ninth birthday of their child. It concerned all singletons born after an IVF treatment between July 2003-December 2006, when two culture media (either G1 version 3 (Vitrolife AB, Goteborg, Sweden) or K-SICM (Cook Medical, Brisbane, Australia)) were used strictly alternating in our laboratory. A total of 136 children (75 Vitrolife and 61 Cook) were included in the analysis. All follow-up measurements were performed between March 2014 and December 2016.

In **Chapter 3**, we evaluated the weight and body composition of these children at 9 years of age and compared the two culture medium groups mutually. Height and height corrected for age and gender (SDS scores) were similar in both groups. Weight and BMI of the Cook children was significantly lower than the average weight and BMI of the Vitrolife children. After correction for confounders, the difference in weight and BMI attributable to culture medium was 1.58kg [95%CI 0.01 to 3.14] and 0.84kg/m²[95%CI 0.02 to 1.67] respectively with the Vitrolife children being heavier. Furthermore, waist circumference was significantly higher in the Vitrolife group with a corrected difference of 3.21cm [95%CI 0.60 to 5.81] leading to a 0.03 increase [95%CI 0.01 to 0.05] in waist/hip ratio. Subscapular skinfolds combined with suprailiacal skinfolds, (defined as truncal adiposity) was also significantly higher in Vitrolife children (adjusted difference 3.44cm [95%CI 0.27 to 6.62]).

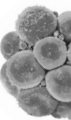
This study showed that *in vitro* culture medium used for human embryos still affects body weight, BMI, truncal adiposity, waist circumference and waist/hip ratio even at the age of 9. These differences may predispose to future (cardiovascular) health risks.

In **Chapter 4**, the impact of culture medium on the cardiovascular development of the children at 9 years of age was investigated. We compared several markers of (early) cardiovascular dysfunction (such as bloodpressure and endothelial function) and took a blood sample from most children after an overnight fast. For the blood samples, we also included a control group using residual blood stored in our hospitals laboratory from children who had their blood tested for several benign reasons not influencing

the outcome parameters of our study. Both systolic (adj. beta 0.364 [95%CI -2.129 to 2.856]) and diastolic (adj. beta 0.275 [95%CI -2.105 to 2.654]) blood pressures (mmHg) were comparable for the two groups. After an overnight fast, TSH, cholesterol, glucose, insulin, LDL, HDL and triglycerides were normal and similar between the two groups. Comparison with the control group showed that HDL was significantly lower in the control group and the triglycerides were significantly higher in the control group compared to the IVF/ICSI groups. Endothelial function in the microcirculation was compared using skin laser-Doppler with iontophoresis by using maximum perfusion units corrected for the baseline value as a measure for vasodilatory capacity. There were no significant differences between the two groups. Cortisol and cortisone concentration in hair samples were also comparable between the two groups. We showed reassuring results on the cardiovascular development of the children in our cohort at this moment. However, as weight and body composition do differ between the groups it is important that long-term health will be closely monitored as cardiovascular alterations might emerge at later age.

In **Chapter 5** we analysed the cognitive development of the children from the two culture medium groups at 9 years of age. To investigate and compare their cognitive development, we used the Dutch pupil monitoring system called CITO (Dutch Central Institute for Test Development). This monitoring system involves nationwide independent, standardized, academic achievement score-tests to monitor the child's school performance twice a year at fixed time points from 3rd grade onwards. The tests include language skills (vocabulary and orthography), math and reading capability and comprehension. Results from the tests performed between 3rd and 6th grade, expressed as ability scores, were obtained from the school the child went to. To investigate school performance development over the years, we used a mixed effects multilevel model. All analyses showed comparable results for the two culture medium groups. No significant differences were observed for any of the cognitive development domains. Parental level of education was higher in the IVF group if compared to the national average level of education, which most likely explains the higher CITO scores for the IVF children if compared to the National ability scores. Although further research on long-term academic skills and also on behavior is essential, these results are reassuring and should make parents of children born after IVF feel comfortable with their children's cognitive development.

In **Chapter 6** we performed a multivariable linear regression analysis to analyse whether growth velocity in early childhood is associated with cardiovascular outcome in the IVF children from the two culture medium groups at 9 years of age. Growth in multiple growth windows were positively associated with blood pressure for example growth from 2-6 years: $B=4.13$, $P=0.005$. Maximum skin perfusion after acetylcholine was negatively associated with height-adjusted weight gain from 2-6 years: $B=-0.09$ (log scale), $P=0.03$. Also



several growth windows were positively linked with total adiposity. Lipids, glucose tolerance indices and cortisone were not related to growth. In conclusion, neonatal, infant and childhood growth are positively related to blood pressure in IVF/ ICSI offspring. Growth in childhood was negatively associated with endothelial function. For reasons of generalizability, we only included healthy children, born at term in this study.

Chapter 7 presents a general discussion of the findings addressed in this thesis within the context of the recent literature. Also a short conclusion, wider implications and future prospects are given.



10

Samenvatting



SAMENVATTING

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie van het onderwerp van dit proefschrift en daarnaast een kort overzicht van de inhoud van dit proefschrift. Het is bekend dat vrouwen die zwanger zijn geworden na een IVF behandeling een hoger risico hebben op complicaties tijdens de zwangerschap zoals een vroeggeboorte of pre-eclampsie. Daarnaast hebben kinderen die geboren zijn na een IVF zwangerschap een verhoogd risico op een lager geboortegewicht vergeleken met kinderen die geboren zijn na natuurlijke bevruchting. Het is nog niet duidelijk wat precies de verklaring is voor de geobserveerde verschillen. Als mogelijke verklaring wordt gedacht aan verschillen in patiëntkenmerken die gepaard gaan met de subfertiliteit, een effect van de ovariële hyperstimulatie of factoren die gepaard gaan met de technische aspecten van de IVF/ICSI behandeling. In dierstudies is het al meermaals aangetoond dat geboortegewicht en postnatale ontwikkeling beïnvloed kunnen worden door het kweekmedium dat gebruikt wordt tijdens de embryokweek. In humane studies is deze relatie nog niet zo duidelijk aangetoond. Dit kan gedeeltelijk verklaard worden door de vele uitdagingen die gepaard gaan met het doen van wetenschappelijk onderzoek naar embryokweek bij humane embryo's. In 2010 publiceerde onze groep de resultaten van een studie waarbij retrospectief de resultaten werden geanalyseerd van een periode waarin we twee verschillende commercieel verkrijgbare kweekmedia alternerend gebruikten. Het bleek dat kinderen die geboren waren na embryokweek in Vitrolife G1, versie 3 (Göteborg, Sweden) kweekmedium een significant hoger geboortegewicht hadden dan de kinderen die als embryo gekweekt waren in K-SICM kweekmedium (Cook Medical, Brisbane Australie). Studies die leidden tot de Barker-hypothese en later de DOHaD-hypothese hebben laten zien dat kinderen die geboren worden met een lager geboortegewicht op latere leeftijd een hoger risico hebben op onder andere cardiovasculaire ziekten. Dit proefschrift focust op het effect van kweekmedium op postnatale ontwikkeling van kinderen die geboren zijn na IVF om te onderzoeken wat de langere termijn gevolgen zijn van het verschil in geboortegewicht.



In **Hoofdstuk 2** bespreken we de resultaten van een gestructureerde literatuurstudie over het effect van kweekmedium op geboortegewicht van de kinderen die geboren worden na een IVF/ICSI behandeling. Alle literatuur die gepubliceerd werd voor 15 oktober 2014 werd opgenomen in dit review, waarmee we in totaal 11 studies konden includeren voor de analyse. Het was niet mogelijk om een conventionele meta-analyse te verrichten, omdat bijna alle studies andere kweekmedia vergeleken. In totaal waren er 22 vergelijkingen met 19 verschillende mediakoppels. Vijf van de geïncludeerde studies rapporteerden een significant verschil in geboortegewicht tussen kinderen die als embryo gekweekt waren in verschillende kweekmedia, maar de resterende 6 studies rapporteerden geen verschil in geboortegewicht. Alle studies die geïncludeerd werden

in de studie hadden methodologische tekortkomingen zoals een retrospectief studie design. Daarnaast vergeleken veel studies kweekmedia die ze in opeenvolgende periodes gebruikt hadden en de studies die de kweekmedia gerandomiseerd (of alternerend) vergeleken, hadden relatief kleine patiëntaantallen. Daarnaast wordt de exacte samenstelling van de verschillende kweekmedia niet openbaar gemaakt door de fabrikanten omdat dit beschouwd wordt als commercieel geheim. Hoewel er dus uit dierstudies en humane studies veel aanwijzingen zijn dat kweekmedium een effect kan hebben op de perinatale uitkomst zoals geboortegewicht, is er nog te weinig overtuigend bewijs in humane studies om dit definitief te kunnen concluderen. Er is nog meer onderzoek nodig naar deze relatie bij humane embryo's. Hierbij zouden ook de effecten van specifieke ingrediënten van de kweekmedia op de lange termijn gezondheid van de IVF kinderen moeten worden meegenomen.

In **Hoofdstuk 3, 4 en 5** bespreken we de resultaten van onze prospectieve cohortstudie (MEDIUM-KIDS) die uitgevoerd werd tussen maart 2014 en december 2016. Het doel van deze studie was om te onderzoeken hoe de kinderen uit onze eerste kweekmedium studie (waarbij een verschil in geboortegewicht gevonden werd) zich ontwikkelen. Alle eenlingen die geboren waren na een IVF/ICSI behandeling tussen juli 2003 en december 2006 kwamen in aanmerking voor deelname. In deze periode werd in ons laboratorium gebruik gemaakt van 2 verschillende kweekvloeistoffen (Vitrolife G1, versie 3 (Göteborg, Sweden) en K-SICM (Cook Medical, Brisbane Australie)) op een strikt alternerende manier. Alle ouders van de kinderen die in aanmerking kwamen werden na de 9^e verjaardag van hun kind benaderd voor deelname aan het onderzoek. In totaal namen 136 kinderen (75 Vitrolife en 61 Cook) deel aan het onderzoek.

Hoofdstuk 3 vergelijkt de antropometrische resultaten van de kinderen uit de twee kweekmedium groepen met betrekking tot hun groei, gewicht en vetgehalte op 9-jarige leeftijd. Lengte en lengte gecorrigeerd voor leeftijd en geslacht was vergelijkbaar tussen de twee groepen. Echter, het gemiddelde gewicht en BMI van de Cook kinderen was significant lager dan het gemiddelde gewicht en BMI van de Vitrolife kinderen. Na correctie voor confounders, was het verschil in gewicht en BMI dat toe te schrijven is aan het kweekmedium respectievelijk 1.58kg [95%CI 0.01 - 3.14] en 0.84kg/m²[95%CI 0.02 - 1.67]. Daarnaast was de taille-omvang significant hoger in de Vitrolife groep, met een gecorrigeerd verschil van 3.21cm [95%CI 0.60 - 5.81]. Dit leidde tot een toename van 0.03 [95%CI 0.01 - 0.05] in taille/heup ratio. Deze studie laat zien dat kweekmedium dat gebruikt wordt voor *in vitro* kweek van embryo's nog altijd effect heeft op het gewicht en BMI van de kinderen op 9 jarige leeftijd. Deze verschillen zouden op latere leeftijd kunnen leiden tot hogere (cardiovasculaire) risico's.

In **Hoofdstuk 4** worden de cardiovasculaire resultaten van de kinderen uit de MEDI-UM-KIDS studie besproken. Om te onderzoeken of kweekmedium op 9-jarige leeftijd al een effect zou kunnen hebben op de cardiovasculaire ontwikkeling van de kinderen hebben we meerdere cardiovasculaire parameters onderzocht, zoals bloeddruk en endotheelfunctie. Daarnaast hebben we nuchter bloed afgenomen bij de meeste kinderen. De resultaten van de bloedmonsters hebben we daarnaast ook nog vergeleken met een controlegroep van kinderen die in ons ziekenhuis bloed hadden geprikt voor andere redenen die geen invloed hadden op de waarden waarnaar wij gekeken hebben. De systolische bloeddruk (adj. beta 0.364 [95%CI -2.129 - 2.856]) en diastolische bloeddruk (adj. beta 0.275 [95%CI -2.105 - 2.654]) (mmHg) waren vergelijkbaar voor de twee groepen. In de bloedmonsters werd gekeken naar TSH, cholesterol, glucose, insuline, LDL, HDL en triglycerides. Deze waarden waren binnen de normaalwaarden en vergelijkbaar voor de twee groepen. Bij de vergelijking met de controlegroep bleek dat HDL significant hoger was in de IVF groepen en dat triglyceriden significant hoger waren in de controlegroep. Endotheelfunctie in de microcirculatie (een vroege marker voor cardiovasculaire disfunctie) werd geanalyseerd met laser-doppler en iontophorese. Er werd gekeken naar maximale perfusie eenheden en dit was niet verschillend tussen de twee kweekmedium groepen. Cortisol en cortison concentraties in de haarsamples waren niet verschillend tussen de twee groepen. Deze studie laat zien dat de cardiovasculaire ontwikkeling van de kinderen uit ons cohort op 9 jaar normaal is en vergelijkbaar tussen de twee kweekmedium groepen. Het is echter wel belangrijk om de kinderen op langere termijn te vervolgen, zeker omdat gebleken is dat de kinderen in de Vitrolife groep zwaarder waren en een hoger BMI hadden.

In **Hoofdstuk 5** beschrijven we de cognitieve ontwikkeling van de kinderen uit de twee kweekmedium groepen. Om dit te onderzoeken hebben we gebruik gemaakt van het CITO leerling volgsysteem. Dit Nederlandse volgsysteem is ontwikkeld om de leerprestaties van leerlingen over de tijd te kunnen volgen. Er wordt gekeken naar taalvaardigheid (woordenschat en spelling), rekenen, begrijpend lezen en technisch lezen. We hebben alle beschikbare resultaten van de kinderen meegenomen van groep 3 tot en met groep 6. Daarbij is gekeken naar de 'vaardigheidsscore' die als een gestandaardiseerde maat kan worden gezien waarmee de kinderen onderling maar ook met een landelijk gemiddelde kunnen worden vergeleken. Om de ontwikkeling over de tijd te kunnen vergelijken hebben we gebruik gemaakt van een mixed effects multilevel model. Alle analyses van de verschillende domeinen lieten zien dat de cognitieve ontwikkeling van de twee kweekmedium groepen vergelijkbaar was. Er waren geen significante verschillen tussen de twee groepen. Als de IVF/ICSI kinderen echter vergeleken werden met de Nederlandse gemiddelden dan scoorde de IVF groep op bijna alle domeinen significant beter. Dit is meest waarschijnlijk (gedeeltelijk) toe te schrijven aan een gemiddeld hoger opleidingsniveau van de IVF ouders



vergeleken met het gemiddelde nationale opleidingsniveau in dezelfde leeftijdscategorie. De resultaten van deze studie zijn geruststellend met betrekking tot de cognitieve ontwikkeling van de IVF kinderen.

Hoofdstuk 6 beschrijft een multivariabele lineaire regressie analyse om te ontdekken of groeisnelheid op de vroege kinderleeftijd geassocieerd is met de cardiovasculaire uitkomsten op 9-jarige leeftijd van de IVF kinderen uit de eerder genoemde prospectieve cohortstudie. Het bleek dat groeisnelheid in meerdere groei-windows positief geassocieerd was met de bloeddruk, bijvoorbeeld groei van 2-6 jaar: $B=4.13$, $P=0.005$. Maximale doorbloeding van de microvascularisatie in de huid na toediening van acetylcholine was juist negatief geassocieerd met een snelle gewichtstoename tussen 2-6 jaar ($B=0.09$ (log scale), $P=0.03$). Groeisnelheid in meerdere groei windows waren positief gecorreleerd met het totale vetgehalte. Lipidenprofiel, glucose tolerantie en cortisol concentraties waren niet gerelateerd aan groeisnelheid. Concluderend, neonatale groei en groei in de vroege jeugd waren positief gecorreleerd met bloeddruk in kinderen die geboren zijn na IVF/ICSI. Groei in de vroege jeugd was negatief geassocieerd met endotheelfunctie. Om de resultaten van deze studie ook te kunnen extrapoleren naar andere populaties hebben we ervoor gekozen prematuur geboren kinderen te excluderen.

In **Hoofdstuk 7** wordt tenslotte een algemene discussie en beschouwing van de resultaten gepresenteerd in de context van de huidige literatuur. Daarnaast wordt er kort ingegaan op de toekomstige implicaties van de resultaten van dit onderzoek.

